

最先端・次世代研究開発支援プログラム  
事後評価書

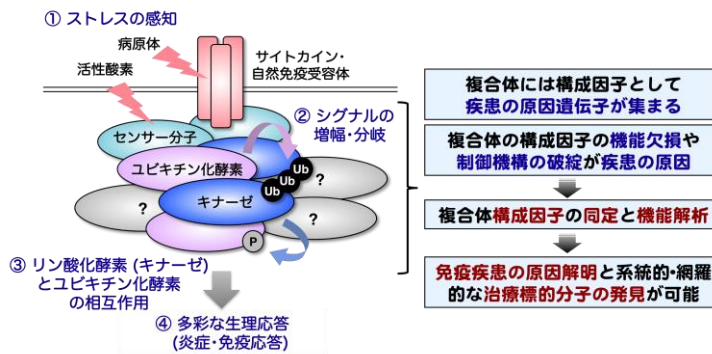
研究課題名	シグナルの新たな作動原理とその異常による炎症・自己免疫疾患発症メカニズムの解明
研究機関・部局・職名	東京大学・大学院薬学系研究科・特任准教授
氏名	松沢 厚

## 【研究目的】

感染症は、肺炎および癌や心・脳血管疾患の経過中の感染症も含めると、最も重大な死亡原因の一つであり、また癌や動脈硬化、アルツハイマー病などの発症・進展にも炎症が深く関わっている。感染症と炎症・免疫疾患の克服は、国民の生活向上のための喫緊の課題であり、ライフ・イノベーションの重要なテーマである。炎症の増悪化や過剰な免疫応答を厳密に制御できれば、自己免疫疾患など多くの疾患への新たな治療戦略開発に繋がるが、これまで、その厳密なシグナルの制御の仕組みは不明であった。最近我々は、様々なシグナル分子が免疫受容体などに集積した“イムノシグナロソーム(免疫シグナル複合体)”が、感染ストレスの感知や免疫シグナルの増幅・分岐など高度な情報処理装置として機能し、複合体内でのキナーゼとユビキチン化酵素などのシグナル制御因子の相互作用を介して、免疫・ストレス応答シグナルの強度や持続時間の制御を行っていることを見出した(Matsuzawa, *Science*, 2008) (Matsuzawa, *Nature Immunology*, 2010) (【図1】参照)。したがって、複合体構成因子の機能欠損など、シグナル制御の破綻は、免疫応答の持続時間・強度の異常による炎症・自己免疫疾患の原因となる。本研究では、複合体を構成するキナーゼやユビキチン化酵素などの構成因子を同定し、その生理機能とシグナル制御機構を詳細に解析することで、免疫シグナルの緻密な制御を可能とする新しいタイプの炎症・免疫疾患に対する治療標的分子の同定や治療戦略開発に繋げることを目的とする。

具体的な課題の一つは、①免疫シグナル複合体の構成因子であるキナーゼやユビキチン化酵素、その制御因子などを網羅的に同定し、その生理機能を解析することで、それらの相互作用による新たな免疫シグナルの制御機構を解明することである。キナーゼに対する特異的な pull-down 法や、タンパク質分解の蛍光イメージング検出系を用いたユビキチン化酵素の siRNA スクリーニングにより、キナーゼ結合分子やユビキチン化関連酵素の同定を試みる。もう一つは、②同定した複合体構成因子に対して、遺伝子ノックダウン等の分子生物学的手法や欠損動物等を用い、感染や炎症・免疫疾患モデルでの実際の病態生理機能・役割について薬理的解析なども含めて明確にし、新たな治療戦略の妥当性を検討することである。目的の分子の分子レベルでの機能・作用点を細胞・個体レベルで検証し、その分子の制御異常による炎症増悪化や免疫疾患の発症メカニズムを明らかにしたい。

### 免疫シグナル複合体 (イムノシグナロソーム)



【図1】免疫シグナル複合体(イムノシグナロソーム)は、病原体の感知やシグナルの増幅・分岐を行い、リン酸化酵素(キナーゼ)とユビキチン化酵素の相互作用を介して、多様な生理応答を誘導する。複合体には疾患の原因遺伝子が集まっており、複合体の構成因子の機能欠損や制御機構の破綻が疾患の原因となっている。従って、複合体構成因子の同定・機能解析を行うことで、免疫疾患の原因解明と系統的・網羅的な治療標的分子の発見が可能となる。

### 【総合評価】

	特に優れた成果が得られている
○	優れた成果が得られている
	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

### 【所見】

#### ① 総合所見

キナーゼのアクセサリ因子同定においては、キナーゼ分解ユビキチン化酵素に焦点を当てた蛍光イメージングを用いた siRNA スクリーニング法、および ASKA マウスを用い ATP アナログを釣り針にケミカルバイオロジー的 pull-down 法など汎用性の高い手法を開発した。本手法を用い、MAP3 キナーゼの1つである ASK1 と限られたキナーゼ対象ではあるが、同定した複数の因子が炎症・免疫機能に関与していることを明らかにし、イムノシグナルソームの概念の正当性を検証するとともに、こうして見つけ出される因子が創薬標的に成り得ることを示唆した。さらに、Roquin-2 の欠損線虫では ASK1 の活性化の亢進によって緑膿菌感染に対する抵抗性が高まること、また TRIM48(ASK1 活性化因子)のノックダウン細胞では免疫応答が著しく低下することを見出し、さらに ASK1 キナーゼ変異体ノックインマウスに ATP アナログを阻害剤として用いることで、実際に、代表的な免疫疾患モデルである接触性皮膚炎モデルの症状が、ATP アナログ投与で軽減すること、その作用が主に炎症性 T 細胞の抑制によるものであることも解明し、生体内での ASK1 の免疫疾患治療標的としての妥当性を薬理的に評価した。さらにこれらの結果を、*Science Signaling*, *J. Biol. Chem.*, *Molecular Cell*, *Nature Communications*, *Blood* など IF 値が高い雑誌に 9 編公表したことは高く評価できる。

## ② 目的の達成状況

・所期の目的が

( 全て達成された ・  一部達成された ・  達成されなかった)

研究代表者は当初の目標として、(1) イムノシグナルソーム構成因子の網羅的同定と機能解析、(2) 同定した構成因子の欠損マウス等を用いた薬理的解析を、2つの大きな目標として掲げていた。(1)に関しては、独自の pull-down 法や siRNA スクリーニング法のいずれも完成させ、それらの方法を用いて、研究対象の一つである ASK1 キナーゼの免疫シグナル複合体の構成因子として新たに4つのユビキチン化酵素を同定し、そのうち2つ(Roquin-2 と TRIM48)については ASK1 シグナルの制御因子として感染や免疫応答に重要な分子であることを見出した(Roquin-2 については Science の姉妹紙に論文成果: Maruyama, **Science Signaling**, 2014; TRIM48 については投稿準備中)。さらに、ASK1 の活性化因子としてレドックスセンサー分子 Prx1 や DNA ヘリカーゼの一つ DHX15 を見出しており、特に DHX15 はウイルス感染の感知・防御応答に関わることを明らかにした(DHX15 の論文成果: Mosallanejad, **Science Signaling**, 2014)。一方、(2)に関しては、Roquin-2 の欠損線虫で ASK1 の活性化の亢進によって緑膿菌感染に対する抵抗性が高まること、また TRIM48(ASK1 活性化因子)のノックダウン細胞で免疫応答が著しく低下することを見出し、さらに ASK1 キナーゼ変異体ノックインマウスに ATP アナログを阻害剤として用いることで、代表的な免疫疾患モデルである接触性皮膚炎モデルの症状が軽減すること、その作用が主に炎症性 T 細胞の抑制によるものであることも解明し、生体内での ASK1 の免疫疾患治療標的としての妥当性を薬理的に評価した(前述の Maruyama, **Science Signaling**, 2014; および投稿準備中)。さらに、別のキナーゼである ASK2 についても、ASK2 欠損マウスを用いた LPS 誤嚥肺炎モデルにおいて、気道炎症が増強していることを見出し、ASK2 が炎症の収束に機能していることを明らかにした(Okada, **J. Biol. Chem.**へのリバイス中)。以上のように当初の課題はすべて達成されたと評価することができる。

## ③ 研究の成果

・これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が

( ある ・  ない)

・ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が

( 創出された ・  創出されなかった)

・当初の目的の他に得られた成果が ( ある ・  ない)

免疫シグナル複合体の構成因子として、ASK1 に結合する4つのユビキチン化酵素を見だし、2つについては機能解析を終えている。その他に ASK1 活性化因子も複数見だし、免疫シグナル複合体の実態と病態生理学的な役割について、先進性と優位性のある研究業績を生み出した。また、研究の中で新たに開発した蛍光イメージングによる siRNA スクリーニング法や、変異体分子を上手く用いたケミカルバイオロジー的プルダウン法といった技術的な先進性と優位性もある。

本研究課題の目的は、イムノシグナルソーム概念の実体の検証とキナーゼアクセサリ因子が新たな創薬標的に成り得ることの証明であり、この目的は達成された。本研究中に、ASK1 キナーゼの新たな特異的ユビキチン化酵素として同定され、そのノックダウンにより免疫応答が低下することが明らかになった TRIM48 の機能解析の過程で、ユビキチン化分解の基質となる標的分子が ASK1 の阻害分子であるという学術的発見をした点は特筆すべき成果であると同時に、当初の目的の他に得られた成果である。また、いくつかのユビキチン化・脱ユビキチン化酵素が ASK1 複合体構成因子として ASK1 活性化を厳密に制御することを明らかにできたことはシグナル伝達研究のブレークスルーになりうる可能性がある。

当初の目的の他に得られた成果として、TRIM48 の機能解析の過程で、TRIM48 のユビキチン化分解の基質となる標的分子 PRMT1 を発見し、それが ASK1 の阻害分子であることを見出した。このようにシグナル複合体研究は、関連する分子が効率良く同定でき、連鎖して起こる現象を同時に解明できるというメリットがある。

#### ④ 研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が  
(見込まれる ・ 見込まれない)

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が  
(見込まれる ・ 見込まれない)

本研究課題で開発した2つの手法(ケミカルバイオロジー的手法による pull-down 法と蛍光イメージングによるユビキチン化酵素の siRNA スクリーニング法)は汎用的にキナーゼシグナルをより深く理解する上で有用である。従って、炎症関連に限らず、種々の growth factor のシグナル研究の進展や、それらからの創薬標的の発見に繋がる可能性がある。

#### ⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが (行われた ・ 行われなかった)

当初の研究計画のみならず年次計画、報告書は詳細にわたり適切であり、十分な研究体制(博士研究員の雇用、国内共同研究、および海外共同研究)において適切なマネジメントがなされたと評価できる。助成金は合目的で有効な利活用がなされた。国民との科学・技術対話の取り組みも十分になされた。しかし、本研究は創薬研究に繋がる可能性があり、国内製薬企業や東京大学オープンイノベーションセンターとの共同研究を行ったにも関わらず知的財産権の出願・取得状況がないのは残念である。今後の検討に期待したい。